Standar Nasional Indonesia

SNI 0005:2013

Lada hitam

ICS 67.220.10

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Prakata

Lada hitam (*Piper nigrum* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki potensi ekspor cukup besar. Dalam rangka memberikan jaminan mutu untuk meningkatkan daya saing produk tersebut, maka lada hitam yang dihasilkan harus memenuhi standar yang diterima konsumen secara luas, baik di pasar dalam negeri maupun pasar internasional.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 01-0005-1995, *Lada hitam*, berdasarkan usulan dari pihak pemangku kepentingan dan hasil kaji ulang.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-03 Pertanian dan telah dibahas dalam rapat teknis serta terakhir dibahas dalam rapat konsensus di Bogor pada tanggal 9 November 2011 yang dihadiri oleh anggota Panitia Teknis.

Standar ini juga telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 9 Februari 2012 sampai dengan 8 April 2012, dengan hasil akhir RASNI.

Lada hitam

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan klasifikasi dan syarat mutu lada hitam utuh.

2 Acuan normatif

Untuk acuan normatif tidak bertanggal berlaku edisi terakhir (termasuk revisi dan atau amandemennya).

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan.*

3 Istilah dan definisi

3.1
lada hitam
buah tanaman *Piper nigrum* L. yang dipetik setelah sebagian besar buah lada matang petik untuk lada hitam dan telah mengalami perontokan dan pengeringan

3.2
matang petik
keadaan saat buah lada telah lengkap pertumbuhannya akan tetapi kulitnya masih berwarna hijau tua dan belum berubah warna menjadi kekuningan atau kemerahan

3.3
cemaran serangga
keadaan lada yang ditentukan ada tidaknya serangga, baik hidup maupun mati serta bagian-bagian yang berasal dari serangga

3.4
biji enteng
hasil samping dari pengolahan lada hitam yang mempunyai bobot lebih ringan dari pada bobot normal, yang disebabkan karena dipetik muda atau buah tidak normal tumbuhnya, ditandai dengan sifatnya yang mengapung dalam larutan 70 % etanol-air (bj, 0,80-0,82)

3.5
benda asing
benda-benda lain selain biji lada hitam

3.6
cemaran kapang
keadaan biji lada hitam yang ditumbuhi kapang yang dapat dilihat dengan mata normal

4 Klasifikasi

4.1 Lada hitam

Lada hitam, dibedakan menjadi 2 (dua) jenis mutu, yaitu:
a. Mutu I
b. Mutu II

5 Syarat mutu

5.1 Syarat umum

Bebas dari serangga hidup maupun mati serta bagian-bagian yang berasal dari serangga.

5.2 Syarat khusus

Persyaratan khusus lada hitam sesuai Tabel 1.

Tabel 1 - Persyaratan mutu

No	Spesifikasi	Satuan	Persyaratan	
			Mutu I	Mutu II
1.	Kerapatan min	g/l	550	500
2.	Kadar air, (b/b) maks	%	12,0	14,0
3.	Kadar biji enteng, (b/b) maks	%	2,0	5,0
4.	Kadar benda asing, (b/b) maks	%	1,0	2,0
5.	Kadar cemaran kapang, (b/b) maks	%	1,0	1,0
6.	*Salmonella*	*Detection*/25 g	Negatif	Negatif
7.	*E.coli*	MPN/g	< 3	< 3

6 Cara pengambilan contoh

Pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428. Jumlah yang diambil 1 kg dari setiap lot untuk penentuan mutu.

7 Metode uji

7.1 Syarat umum

Penentuan kadar cemaran serangga sesuai dengan Lampiran A.

7.2 Syarat khusus

7. 2.1 Kerapatan

Penentuan kerapatan sesuai Lampiran B.

7.2.2 Kadar air

Penentuan kadar air sesuai Lampiran C.

7.3 Kadar biji enteng

Penentuan kadar biji enteng sesuai dengan Lampiran D.

7.4 Kadar benda asing

Penentuan kadar benda asing sesuai dengan Lampiran E.

7.5 Cemaran kapang

Penentuan cemaran kapang sesuai dengan Lampiran F.

7.6 Cemaran *Salmonella*

Penentuan cemaran *Salmonella* sesuai dengan Lampiran G.

7.7 Cemaran *E. coli*

Penentuan cemaran *E. coli* sesuai dengan Lampiran H.

8 Syarat penandaan

Untuk setiap pengirim, pada bagian luar dari karung harus mencantumkan keterangan sekurang-kurangnya sebagai berikut :

a. Nama dan alamat perusahaan;
b. Nama produk;
c. jenis mutu;
d. berat bersih;

9 Cara pengemasan

Lada dikemas dalam wadah yang dapat melindungi dan tidak mempengaruhi mutu produk.

10 Rekomendasi

10.1 Syarat mutu

No	Spesifikasi	Satuan	Persyaratan	
			Mutu I	Mutu II
1.	Kadar piperin	% (b/b) min., basis kering	Sesuai hasil pengujian	Sesuai hasil pengujian
2.	Kadar minyak atsiri	% (v/b) min., basis kering	Sesuai hasil pengujian	Sesuai hasil pengujian

10.2 Penentuan kadar piperin sesuai dengan Lampiran I.

10.3 Penentuan kadar minyak atsiri sesuai dengan Lampiran J.

Lampiran A
(normatif)
Penentuan cemaran serangga

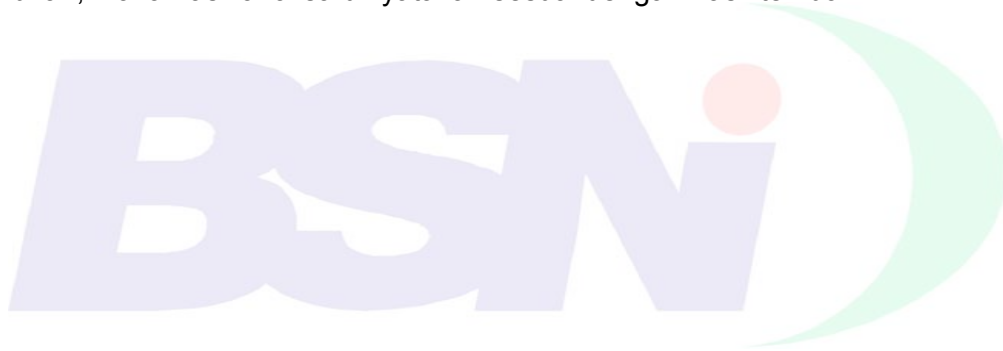
A.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji secara visual.

A.2 Prosedur

Sebarkan seluruh contoh di atas selembar kertas putih dan amati terhadap serangga hidup maupun mati serta bagian-bagian yang berasal dari binatang. Setelah pengamatan selesai dilakukan, contoh segera dikembalikan ke tempat semula (ke dalam kantung plastik).

A.3 Pernyataan hasil

Apabila ditemukan adanya cemaran binatang, maka hasil uji dinyatakan bebas dari serangga hidup maupun mati serta bebas dari bagian-bagian yang berasal dari binatang. Apabila ditemukan, maka hasil analisa dinyatakan sesuai dengan hasil temuan.

Lampiran B
(normatif)
Penentuan kerapatan

B.1 Prinsip

Metode ini berdasarkan berat contoh dalam volume 1000 ml.

B.2 Peralatan

- gelas ukur 1000 ml;
- corong besar dengan kapasitas lebih dari 1000 ml;
- timbangan dengan ketelitian 0,1 g.

B.3 Prosedur

- Timbang gelas ukur 1000 ml.
- Masukkan lada yang akan diukur ke dalam gelas ukur melalui corong sampai ukuran 1000 ml.
- Timbang gelas ukur + contoh.
- Lakukan sebanyak 3 kali.

B.4 Perhitungan

Berat gelas ukur + contoh – berat gelas ukur kosong = berat contoh

$$\frac{\text{Berat contoh}}{\text{volume}} = {}^{g}/_{l}$$

Lampiran C
(normatif)
Penentuan kadar air

C.1 Prinsip

Penentuan jumlah air yang dipisahkan dengan cara destilasi dengan menggunakan pelarut organik (toluen) yang tidak bercampur dengan air dan ditampung dalam penampung berskala.

C.2 Peralatan

- labu destilasi dengan kapasitas 500 ml;
- pendingin refluks;
- penampung atau trap berukuran;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- pemanas listrik;
- penggiling mekanis atau blender;
- ayakan dengan ukuran 0,5 mm atau 0,1 mm;
- kawat tembaga berujung spiral.

C.3 Bahan kimia

- Toluen, jenuhkan dengan mengocoknya dengan sejumlah kecil air dan sulinglah. Gunakan destilat ini untuk penentuan kadar air.
- Larutan kalium bikromat-asam sulfat.
- Batu didih.

C.4 Prosedur

C.4.1 Bersihkan seluruh alat yang akan digunakan dengan larutan pencuci campuran kalium bikromat dan asam sulfat untuk memperkecil melekatnya tetes-tetes air pada sisi dalam penampung dan pendingin. Bilas dengan air secara baik dan keringkan dengan sempurna sebelum alat tersebut digunakan.

C.4.2 Persiapan contoh uji

Haluskan sejumlah contoh uji yang telah dipersiapkan dengan menggunakan penggiling mekanis yang tidak menimbulkan panas atau blender sehingga diperoleh contoh uji sesuai dengan kehalusan yang diperlukan, kemudian diayak.

C.4.3 Contoh uji yang diperiksa

Timbang mendekati 0,001 g, 40 g contoh uji yang lolos ayakan sehingga banyaknya volume air yang tertampung dalam penampang berkisar antara 4 ml – 5 ml.

C.4.4 Penentuan

Pindahkan contoh uji ke dalam labu destilasi secara kuantitatif dengan toluen, tambahkan toluen secukupnya (kira-kira 75 ml), kocok perlahan-lahan sehingga tercampur dengan sempurna dan semua contoh uji terendam. Tambahkan juga ke dalam labu destilasi beberapa butir batu didih. Pasanglah alat destilasi dan isi penampung dengan toluen melalui

pendingin sampai mulai meluap ke dalam labu destilasi, jika perlu sisipkanlah sumbat kapas
pendingin sampai mulai meluap ke dalam labu destilasi, jika perlu sisipkanlah sumbat kapas
yang longgar di bagian atas pendingin atau pasanglah sebuah tabung pengering kecil yang berisi kalium klorida untuk mencegah pengembunan uap air dari udara di dalam tabung pendingin.

C.4.5 Pemanasan labu sedemikian rupa sehingga kecepatan destilasi adalah kira-kira 100 tetes per menit. Bila sebagian besar air telah tersuling, naikkanlah kecepatannya kira-kira 200 tetes per menit, dan teruskanlah sehingga tidak ada lagi air yang tertampung. Sewaktu pemanasan berlangsung, sekali-kali bersihkan dinding sebelah dalam dari pendingin dengan 5 ml toluen, untuk membilas air yang mungkin melekat pada dinding pendingin. Air dalam penampung dapat dipaksa untuk memisah dari toluen dengan sekali-kali menggerakkan sebuah kawat tembaga berujung spiral turun naik dalam pendingin dan penampung sehingga seluruh air mengendap pada dasar penampung.

C.4.6 Destilasi dihentikan apabila setelah ± 30 menit air tidak lagi bertambah dalam penampung. Bilas pendingin dengan toluen bila diperlukan gunakan kawat tembaga berujung spiral untuk melepaskan tetes-tetes air yang ada. Dinginkanlah penampung sampai suhu kamar atau apabila lapisan toluen telah menjadi jernih dan kemudian baca volume air dalam penampung, yang dapat dinyatakan sebagai bobot air karena rapat massa air tetap 1 g/ml.

C.5 Perhitungan

Kadar air, dalam persentase bobot per bobot sama dengan :

$$\frac{B}{M} \times 100$$

Keterangan :
B adalah bobot air (g)
M adalah bobot contoh uji (g)

Lampiran D
(normatif)
Penentuan kadar biji enteng

D.1 Prinsip

Pemisahan lada enteng pada permukaan larutan 70 % etanol-air. Hanya biji yang mengapung di permukaan larutan saja yang dipisahkan (biji yang melayang di bawah permukaan larutan tidak termasuk biji enteng).

D.2 Peralatan

- gelas piala kapisatas 600 ml;
- gelas ukur kapasitas 100 ml;
- kaca arloji;
- sendok/pengaduk;
- pinset;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- kertas saringan/tissue.

D.3 Bahan kimia

Larutan 70 % etanol-air dengan kerapatan relatif pada 20/20 °C, 0,80 – 0,82 g/cm^3.

D.4 Prosedur

D.4.1 Timbang mendekati 0,01 g, 50 g contoh uji ke dalam gelas piala tambahkan 300 ml larutan 70 % etanol-air dan aduk dengan sendok. Biarkan selama 2 menit dan kemudian ambil biji yang mengapung pada permukaan cairan.

D.4.2 Ulangi cara ini (pengadukkan, pengendapan dan pemisahan biji yang mengapung) hingga tidak ada lagi biji yang mengapung pada permukaan cairan, setelah pengadukkan dua kali berturut-turut.

D.4.3 Keringkan lada enteng tersebut dengan menebarkannya diatas kertas saring atau tissue sampai kering kira-kira selama 1 jam kemudian di timbang.

D.5 Perhitungan

Kadar biji enteng dinyatakan dalam presentase bobot/bobot sama dengan :

$$\frac{M_1}{M_0} \times 100$$

Keterangan :
M_0 adalah bobot contoh uji (g)
M_1 adalah bobot lada enteng (g)

Lampiran E
(normatif)
Penentuan kadar benda asing

E.1 Prinsip

Pemisahan secara visual dan penimbangan.

E.2 Peralatan

- kaca arloji;
- pinset;
- gelas piala kapasitas 250 ml;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg.

E.3 Prosedur

Timbang contoh uji antara 100 g - 200 g, kemudian pisahkan secara visual benda lain yang dinyatakan sebagai benda asing kedalam kaca arloji yang telah diketahui bobotnya lalu di timbang.Perbedaan kedua penimbangan itu menunjukkan jumlah benda asing dalam contoh uji.

E.4 Perhitungan

Kadar benda asing dinyatakan dalam persentase bobot per bobot sama dengan :

$$(M_2 - M_1) \times \frac{100}{M_0}$$

Keterangan :
M_0 adalah bobot contoh uji (g)
M_1 adalah bobot kaca arloji kosong (g)
M_2 adalah bobot kaca arloji dan benda asing (g)

Lampiran F
(normatif)
Penentuan cemaran kapang

F.1 Prinsip

Pemisahan lada yang terkontaminasi kapang secara visual lada dianggap berkapang jika tercemar kapang yang dapat dilihat dengan mata biasa.

F.2 Peralatan

- kaca arloji;
- pinset;
- gelas piala kapasitas 250 ml;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg.

F.3 Prosedur

- Timbang contoh uji seberat 100 g - 200 g.
- Pisahkan lada yang berkapang yang terlihat dengan mata biasa kemudian ditimbang.

F.4 Perhitungan

Kadar kontaminasi kapang dinyatakan dalam persentase bobot per bobot sama dengan :

$$\frac{M_1}{M_0} \times 100$$

Keterangan:
M_0 adalah bobot contoh uji (g)
M_1 adalah bobot lada yang berkapang (g)

Lampiran G
(normatif)
Penentuan cemaran *Salmonella spp*

G.1 Prinsip

Pertumbuhan *Salmonella* pada media selektif dengan pra pengayaan (*pre-enrichment*), dan pengayaan (*enrichment*) yang dilanjutkan dengan uji biokimia dan uji serologi.

G.2 Media dan reagen

- LB;
- SCB;
- TTB;
- RV;
- XLDA;
- HEA;
- BSA,
- TSIA;
- LIA;
- LDB;
- KCNB;
- MR-VP;
- SCB;
- TB;
- TSTB;
- SIM;
- *Reagen Kovac;*
- BHI*;*
- *Urea Broth;*
- *Malonate Broth;*
- *Phenol Red Lactose Broth;*
- *Phenol Red Sucrose Broth;*
- Kristal keratin;
- *Larutan Bromcresol Purple Dye* 0,2 %;
- *Larutan Physiological Saline* 0,85 %;
- *Larutan Formalinized Physiological Saline;*
- *Salmonella Polyvalent Somatic* (O) *Antiserum* A-S*;*
- *Salmonella Polyvalent Flagellar* (H) *Antiserum* Fase 1 dan 2*;*
- *Salmonella Somatic Grup* (O) *Monovalent Antisera :* Vi*.*

G.3 Peralatan

- erlenmeyer
- cawan petri;
- tabung reaksi;
- pipet ukuran 1ml, 2ml, 5ml, 10ml;
- botol media;
- gunting;
- pinset;
- jarum inokulasi (*ose*);
- *stomacher;*

- pembakar bunsen;
- pH meter;
- timbangan;
- *magnetic stirer*;
- pengocok tabung (*vortex*);
- inkubator;
- penangas air;
- autoklaf;
- lemari steril *(clean bench);*
- lemari pendingin (*refrigerator*);
- *freezer*.

G.4 Cara uji

Setiap proses pengujian selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.

G.4.1 Pra-pengayaan

- Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur sebanyak 25 ml contoh cair secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.
- Pindahkan suspensi ke dalam erlenmeyer atau wadah steril.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.

G.4.2 Pengayaan

G.4.2.1 Aduk perlahan biakan pra-pengayaan kemudian ambil dan pindahkan masing-masing 1 ml ke dalam media 10 ml TTB, sedangkan untuk media RV pindahkan 0,1 ml ke dalam 10 ml RV.

G.4.2.2 Contoh dengan dugaan cemaran *Salmonella* spp. tinggi (*high microbial load).* Inkubasikan media RV pada temperatur 42 °C ± 0,2 °C selama 24 jam ± 2 jam. Sedangkan untuk media TTB inkubasi pada temperatur 43 °C ± 0,2 °C selama 24 jam ± 2 jam.

G.4.2.3 Contoh dengan dugaan cemaran *Salmonella* spp. rendah (*low microbial load).* Inkubasikan media RV pada temperatur 42 °C ± 0,2 °C selama 24 jam ± 2 jam. Sedangkan untuk media TTB inkubasi pada temperatur 35 °C ± 2 °C selama 24 jam ± 2 jam.

G.4.3 Isolasi dan identifikasi

G.4.3.1 Ambil dua atau lebih koloni dengan jarum *ose* dari masing-masing media pengayaan yang telah diinkubasikan, dan inokulasikan pada media HE, XLD dan BSA. Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam. Untuk *BSA* apabila belum jelas dapat dinkubasikan lagi selama 24 jam ± 2 jam.

G.4.3.2 Amati koloni *Salmonella* pada media HE terlihat berwarna hijau kebiruan dengan atau tanpa titik hitam (H_2S).

G.4.3.3 Pada media XLD koloni terlihat merah muda dengan atau tanpa titik mengkilat atau terlihat hampir seluruh koloni hitam.

G.4.3.4 Pada media BSA koloni terlihat keabu-abuan atau kehitaman, kadang metalik, media di sekitar koloni berwarna coklat dan semakin lama waktu inkubasi akan berubah menjadi hitam.

G.4.3.5 Lakukan identifikasi dengan mengambil koloni yang diduga dari ketiga media tersebut. Inokulasikan ke TSIA dan LIA dengan cara menusuk ke dasar media agar, selanjutnya digores pada media agar miring.

G.4.3.6 Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam. Amati koloni spesifik *Salmonella* dengan hasil reaksi seperti tercantum pada Tabel G.1.

Tabel G.1- Hasil uji *Samonella* sp pada TSIA dan LIA

Media	Agar miring (*Slant*)	dasar Agar (*Buttom*)	H_2S	Gas
TSIA	Alkalin / K (merah)	Asam / A (kuning)	Positif (hitam)	Negatif/ positif
LIA	Alkalin / K (ungu)	Alkalin / K (ungu)	Positif (hitam)	Negatif/ Positif

G.4.4 Uji biokimia

G.4.4.1 Uji *urease*

- Inokulasikan koloni dari positif TSIA dengan *ose* ke *Urea Broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negatif uji *urease*.

G.4.4.2 Uji *indole*

- Inokulasikan koloni dari media TSIA pada TB dan inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml *Reagen Kovacs.*
- Hasil uji positif ditandai dengan adanya cincin merah dipermukaan media.
- Hasil uji negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.
- Hasil uji spesifik *Salmonella* adalah negatif uji *indole*.

G.4.4.3 Uji *voges-proskauer* (VP)

- Ambil biakan dari media TSIA dengan *ose* lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Pindahkan 5 ml MR-VP ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0.6 ml larutan α-naphthol dan 0,2 ml KOH 40 %, kemudian digoyang-goyang sampai tercampur dan didiamkan.
- Untuk mempercepat reaksi tambahkan kristal kreatin. Baca hasil setelah 4 jam.
- Hasil uji positif apabila terjadi perubahan warna pink sampai merah delima.
- Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif untuk uji VP (tidak terjadi perubahan warna pada media).

G.4.4.4 Uji *methyl red* (MR)

- Ambil biakan dari media TSIA dengan *ose* inokulasikan ke dalam tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Tambah 5 tetes sampai dengan 6 tetes indikator *Methyl Red* pada tabung.
- Hasil uji positif ditandai dengan adanya difusi warna merah ke dalam media.
- Hasil uji negatif ditandai dengan terjadinya warna kuning pada media.

- Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif untuk uji MR.

G.4.4.5 Uji *citrate*

- Inokulasikan koloni dari TSIA ke dalam SCA dengan *ose.*
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 96 jam ± 2 jam.
- Hasil uji positif ditandai adanya pertumbuhan koloni yang diikuti perubahan warna dari hijau menjadi biru.
- Hasil uji negatif ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni atau tumbuh sangat sedikit dan tidak terjadi perubahan warna.
- Umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif pada uji *citrate*.

G.4.4.6 Uji *lysine decarboxylase broth* (LDB)

- Ambil satu *ose* koloni dari TSIA dan inokulasikan ke dalam LDB.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam dan diamati setiap 24 jam.
- *Salmonella* memberikan reaksi positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada seluruh media dan hasil reaksi negatif memberikan warna kuning.
- Jika hasil reaksi meragukan (bukan ungu atau bukan kuning) tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromcresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.

G.4.4.7 Uji kalium *cyanida* (KCN)

- Inokulasikan satu *ose* biakan dari TSIA ke media TB.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Ambil satu *ose* koloni dari TB dan inokulasikan kedalam KCNB.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan yang ditandai dengan kekeruhan.
- Hasil uji negatif ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan pada media.
- *Salmonella* memberikan hasil negatif pada uji KCN.

G.4.4.8 Uji gula-gula

G.4.4.8.1 *Phenol red dulcitol broth* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*

- Ambil koloni dari *TSIA* dan inokulasikan pada medium *dulcitol broth.*
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Kebanyakan *Salmonella* memberikan reaksi positif ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung *Durham* dan warna kuning (pH asam) pada media.
- Hasil reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung *Durham* dan pada media terbentuk warna merah (pH basa) untuk indikator *phenol red* atau ungu untuk indikator *bromcresol purple*.

G.4.4.8.2 Uji *malonate broth*

- Pindahkan satu *ose* dari TB kedalam *malonate broth*.
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Hasil uji positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru.
- *Salmonella* memberikan reaksi negatif yang ditandai dengan adanya warna hijau atau tidak ada perubahan warna.

G.4.4.8.3 Uji *phenol red lactose broth*

- Inokulasikan koloni dari TSIA miring ke dalam *Phenol red lactose broth.*
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C dan diamati setiap 24 jam selama 48 jam ± 2 jam.
- Hasil reaksi positif ditandai dengan produksi asam (warna kuning) dengan atau tanpa gas
- *Salmonella* memberikan hasil reaksi negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna dan pembentukan gas.

G.4.4.8.4 Uji *phenol red sucrose broth*

- Inokulasikan koloni dari TSIA miring ke dalam *Phenol red sucrose broth.*
- Inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam dan diamati setiap 24 jam.
- Hasil uji positif ditandai dengan adanya perubahan warna (kuning) dan dengan atau tanpa pembentukan gas.
- *Salmonella* memberikan hasil uji negatif ditandai dengan tidak ada perubahan warna dan pembentukan gas.

G.4.5 Uji *serologis*

G.4.5.1 Uji *polyvalent somatic* (O)

- Letakkan satu ose koloni dari TSIA atau LIA pada gelas preparat dan tambahkan satu tetes larutan garam fisiologis (NaCl 0,85 %) steril dan ratakan dengan kultur.
- Berikan satu tetes *Salmonella polyvalent somatic* (O) antiserum disamping suspensi koloni.
- Campur suspensi koloni ke antiserum sampai tercampur sempurna.
- Miringkan campuran tersebut ke kiri dan ke kanan dengan latar belakang gelap sambil diamati adanya reaksi aglutinasi.
- Siapkan kontrol dengan mencampur larutan garam fisiologis dan antiserum.
- Lakukan uji somatik (O) grup monovalent antisera Vi seperti uji polyvalent di atas.

G.4.5.2 Uji *polyvalent flagelar* (H)

- Koloni dari TSIA yang hasil uji *urease* negatif diinokulasi ke dalam BHIB dan diinkubasi pada temperatur 35 °C selama 4 jam sampai dengan 6 jam atau ke dalam TSTB dan inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 2,5 ml larutan garam fisiologis berformalin (*formalinized physiological saline)* kedalam 5 ml dari salah satu kultur di atas.
- Pipet 0,5 ml larutan *Salmonella Polyvalent flagellar* (H) antisera dan masukkan kedalam tabung serologi ukuran 10 x 75 mm.
- Tambah 0,5 ml antigen yang akan di uji.
- Siapkan larutan garam fisiologis kontrol dengan mencampurkan 0,5 ml larutan garam fisiologis berformalin dengan 0,5 ml antigen berformalin (*formalinized antigen)*.
- Inkubasikan kedua campuran tersebut dalam penangas air pada temperatur 48 °C sampai dengan 50 °C.
- Amati adanya penggumpalan setiap 15 menit selama 1 jam.
- Hasil uji positif ditandai dengan adanya penggumpalan, sedangkan pada kontrol tidak terjadi penggumpalan.

G.5 Interpretasi hasil *Salmonella* spp.

Interpretasi hasil uji biokimia *Salmonella* spp. dapat dilihat pada Tabel G.2 dan Tabel G.3

Tabel G.2 - Reaksi biokimia *Salmonella*

No	Uji substrat	Hasil reaksi		
		Positif	Negatif	*Salmonella*
1	Glukosa (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	Lysine Dekarboksilase(LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	H_2S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	+
5	Lysine Dekarboksilase *Broth*	Warna ungu	Warna kuning	+
6	*Phenol Red Dulcitol Broth*	Warna kuning dan atau dengan gas	Tanpa berubah warna dan tanpa terbentuk gas	+[a)]
7	KCN *Broth*	Ada pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	Malonat *Broth*	Warna biru	Tidak berubah warna	-[b]
9	Uji indol	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10	Uji *Polyvalent flagelar*	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
11	Uji *Polyvalent Somatic*	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	+
12	*Phenol Red Lactose Broth*	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-[b)]
13	*Phenol Red* Sukrosa *Broth*	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14	Uji *Voges-Proskauer*	pink sampai merah	Tidak berubah warna	-
15	Uji *Methyl Red*	Merah menyebar	Warna kuning menyebar	+
16	*Simmon*'s sitrat	Pertumbuhan warna biru	Tidak ada per-tumbuhan dan tidak ada perubahan	-

KETERANGAN

[a)] Mayoritas dari kultur S.arizonae adalah negatif

[b)] Mayoritas dari kultur S.arizonae adalah positif

Tabel G.3 - Kriteria penentuan non *Samonella spp*

No	Uji substrat	Hasil reaksi		
		Positif	**Negatif**	***Salmonella***
1.	Glukosa (TSI)	Tusukan kuning	Tusukan merah	-
2.	Lysine Dekarboksilase(LIA)	Tusukan ungu	Tusukan kuning	-
3.	H_2S (TSI dan LIA)	Hitam	Tidak hitam	-
4.	Lysine Dekarboksilase *Broth*	Warna ungu	Warna kuning	-
5.	*Phenol Red Dulcitol Broth*	Warna kuning dan atau dengan gas	Tanpa berubah warna dan tanpa terbentuk gas	-a)
6.	KCN *Broth*	Ada pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
7.	Malonat *Broth*	Warna biru	Tidak berubah warna	-b
8.	Uji indol	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
9.	Uji *Polyvalent flagelar*	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	-
10.	Uji *Polyvalent Somatic*	Aglutinasi	Tidak aglutinasi	-
11.	*Phenol Red Lactose Broth*	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-b)
12.	*Phenol Red* Sukrosa *Broth*	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak terbentuk gas dan tidak berubah warna	-
13.	Uji *Voges-Proskauer*	pink sampai merah	Tidak berubah warna	-
14.	Uji *Methyl Red*	Merah menyebar	Warna kuning menyebar	-
15.	*Simmon*'s sitrat	Pertumbuhan warna biru	Tidak ada per-tumbuhan dan tidak ada perubahan	-

KETERANGAN

a) Mayoritas dari kultur *S.arizonae* adalah negatif

b) Mayoritas dari kultur *S.arizonae* adalah positif

Lampiran H
(normatif)
Penentuan cemaran *E. Coli*

H.1 Prinsip

Pengujian dilakukan dengan uji pendugaan, uji peneguhan dan isolasi-identifikasi melalui uji biokimia *Indole*, *Methyl red*, *Voges-Proskauer* dan *Citrate* (IMViC).

H.2 Media dan reagensia

- BPW 0,1 %;
- BGLBB;
- LSTB;
- ECB;
- L-EMBA;
- MR-VP;
- PCA;
- KCB;
- SCA;
- *Reagen Kovas;*
- *Reagen Voges-Proskauer (*VP*).*

H.3 Peralatan

- tabung *Durham*;
- cawan Petri;
- tabung reaksi;
- pipet ukuran 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml;
- botol media;
- gunting;
- pinset;
- jarum inokulasi (*ose*);
- *stomacher;*
- pembakar bunsen;
- pH meter;
- timbangan;
- *magnetic stirer*;
- pengocok tabung (*vortex*);
- inkubator;
- penangas air;
- autoklaf;
- lemari steril *(clean bench);*
- lemari pendingin (*refrigerator*);
- *freezer*.

H.4 Penyiapan contoh

Timbang contoh padat dan semi padat sebanyak 25 g atau ukur contoh cair sebanyak 25 ml secara aseptik kemudian masukkan dalam wadah steril.

H.5 Cara uji

Pengujian menggunakan seri 3 tabung, uji isolasi-identifikasi, dan uji biokima.

H.5.1 Seri 3 tabung

H.5.1.1 Uji pendugaan

- Pindahkan 1 ml larutan pengenceran 10^{-1} tersebut dengan pipet steril ke dalam larutan 9 ml BPW 0,1 % untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2}. Dengan cara yang sama seperti di atas dibuat pengenceran 10^{-3}.
- Pipet masing-masing 1 ml dari setiap pengenceran ke dalam 3 seri tabung LSTB yang berisi tabung *Durham*.
- Inkubasi pada temperatur 35 °C selama 24 jam sampai dengan 48 jam.
- Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.

H.5.1.2 Uji konfirmasi (peneguhan)

- Pengujian harus selalu disertai dengan menggunakan kontrol positif.
- Pindahkan biakan positif dari H.5.1.1 poin 4 dengan menggunakan jarum inokulasi dari setiap tabung LSTB ke dalam tabung ECB yang berisi tabung *Durham*.
- Inkubasikan ECB pada temperatur 45,5 °C selama 24 jam ± 2 jam, jika hasilnya negatif inkubasikan kembali selama 48 jam ± 2 jam.
- Perhatikan adanya gas yang terbentuk di dalam tabung *Durham*. Hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk gas.
- Selanjutnya gunakan tabel *Most Probable Number* (MPN) untuk menentukan nilai MPN berdasarkan jumlah tabung ECB yang positif mengandung gas di dalam tabung *Durham* sebagai jumlah *E.coli* per mililiter atau per gram.

H.5.1.3 Interpretasi hasil

Banyaknya koliform yang terdapat dalam contoh uji diinterpretasikan dengan mencocokkan kombinasi jumlah tabung yang memperlihatkan hasil positif, berdasarkan Tabel H.1. Kombinasi yang diambil, dimulai dari pengenceran tertinggi yang masih menghasilkan semua tabung positif, sedangkan pada pengenceran berikutnya terdapat tabung yang negatif. Kombinasi yang diambil terdiri dari tiga pengenceran. Nilai *MPN* contoh dihitung sebagai berikut :

$$\text{MPN contoh (MPN/ml atau MPN/g)} = \frac{\text{nilai MPN tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran yang di tengah}$$

Tabel H.1 - MPN seri tiga tabung

Penghitungan tabel *MPN* seri tiga tabung dengan selang kepercayaan 95 % untuk kombinasi hasil positif dan tabung pengenceran yang digunakan (0,1 ml; 0,01 ml dan 0,001 ml) BAM 2001 atau 2006) sesuai dengan Tabel H.1.

Jumlah tabung positif (3 tabung)			MPN / g	Batas kepercayaan 95 %	
0,1 g	0,01 g	0,001 g		Bawah	Atas
0	0	0	< 3,6	-	9,5
0	0	1	3	0,15	9,6
0	1	0	3	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1.000
3	3	0	240	42	1.000
3	3	1	460	90	2.000
3	3	2	1.100	180	4.100
3	3	3	>1.100	420	--

H.5.2 Isolasi-identifikasi

- Buat goresan pada media L-EMBA atau VRBA dari tabung ECB yang positif, inkubasi pada temperatur 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam.
- Koloni yang diduga *E. coli* berdiameter 2 mm sampai dengan 3 mm, warna hitam atau gelap pada bagian pusat koloni, dengan atau tanpa metalik kehijauan yang mengkilat pada media L-EMBA.
- Ambil koloni yang diduga dari masing-masing media L-EMBA dengan menggunakan ose, dan pindahkan ke PCA miring. Inkubasikan PCA miring pada temperatur 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam untuk uji biokimia.

H.5.3 Uji biokimia dengan uji IMViC.

H.5.3.1 Uji produksi *indole*

- Inokulasikan koloni dari tabung PCA pada TB dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 24 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml reagen *Kovac*.
- Hasil reaksi positif ditandai dengan adanya bentuk cincin merah pada lapisan atas media, sedangkan hasil reaksi negatif ditandai dengan terbentuknya cincin kuning.

H.5.3.2 Uji *voges-proskauer* (VP)

- Ambil biakan dari media PCA lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasikan pada temperatur 35 ºC selama 48 jam ± 2 jam.
- Pindahkan 5 ml MR-VP ke tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml larutan α-naphthol dan 0.2 ml KOH 40 %, kemudian digoyang-goyang.
- Hasil reaksi positif ditandai adanya warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam.

H.5.3.3 Uji *methyl red* (MR)

- Ambil biakan dari media PCA lalu inokulasikan ke tabung yang berisi 10 ml media MR-VP dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 48 jam ± 2 jam.
- Tambahkan 2 tetes sampai dengan 5 tetes indikator MR pada tabung.
- Hasil uji positif ditandai adanya warna merah dan hasil reaksi negatif ditandai adanya warna kuning.

H.5.3.4 Uji *citrate*

- Inokulasikan koloni dari media Agar miring PCA kedalam media KCB, dan inkubasikan pada temperatur 35 °C selama 96 jam.
- Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya kekeruhan pada media.

H.5.3.5 Interpretasi hasil uji biokimia

Klasifikasi *E. coli* adalah Reaksi *IMViC* dengan pola + + - - atau - + - - (Tabel H.2).

Tabel H.2 - Hasil reaksi *Indole, Methyl Red, Voges- Proskauer, Citrate* (IMViC) terhadap *E. coli*

Tipe Organisme	*Indol*	*MR*	*VP*	*Citrate*
E. coli spesifik	+	+	-	-
E. coli non spesifik	-	+	-	-
Typical intermediate	N/A	+	-	+
Atypical intermediate	-	+	-	+
Typical Enterobacter aerogenes	-	-	+	+
Atypical Enterobacter aerogenes	+	-	+	+

H.6 Interpretasi hasil akhir

Jumlah *E. coli* dinyatakan berdasarkan hasil *MPN*, Isolasi - identifikasi, dan uji biokimia.

Lampiran I
(normatif)
Penentuan kadar piperin

I.1 Prinsip

Ekstraksi dengan etanol dan pengukuran absorban pada panjang gelombang 343 nm dengan alat spektrofotometer ultra violet.

I.2 Peralatan

- labu destilasi kapasitas 100 ml;
- pendingin;
- pipet volume 5 ml;
- labu takar kapasitas 100 ml, 50 ml, dan 25 ml;
- *heating mantel*;
- spektrofotometer ultra violet;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg;
- alumunium foil atau kertas timah

I.3 Bahan kimia

etanol 96 %;

I.4 Prosedur

- Bungkus terlebih dahulu alat-alat yang akan digunakan dengan alumunium foil atau kertas timah.
- Timbang contoh seberat 0,5 g dengan ketelitian 0,01 g ke dalam labu didih dan ditambahkan 50 mL etanol dan beberapa butir batu didih.
- Pasanglah alat sedemikian rupa dan panaskan selama 3 jam, kemudian dinginkan dan saring ke dalam labu takar 100 mL, tepatkan volume larutan dalam labu takar sampai tanda garis dengan etanol (larutan A).
- Pipet 5 mL larutan A, pindahkan ke dalam labu takar 50 mL dan encerkan sampai tanda garis dengan etanol (larutan B).
- Pipet 5 mL larutan B, pindahkan ke dalam labu takar 25 mL dan encerkan sampai tanda garis dengan etanol (larutan C).
- Ukurlah absorban larutan C dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 343 nm dengan menggunakan etanol sebagai blanko.

I.5 Perhitungan

Kadar piperin dinyatakan sebagai persentase bobot berdasarkan bobot kering sebagai berikut :

$$\frac{A}{A_1\,cm^{1\,\%}} \times \frac{50}{5} \times \frac{25}{5} \times \frac{100}{M} \times \frac{100}{100 - KA}$$

Keterangan :

M adalah bobot contoh uji (g)

KA adalah kadar air dari contoh uji

A adalah absorban larutan contoh

$A_1cm^{1\,\%}$ adalah absorban pada 343 nm dari 1 % larutan piperin dan cell 1 cm yaitu 1238

Lampiran J
(normatif)
Penentuan kadar minyak atsiri

J.1 Prinsip

Pemisahan minyak atsiri dengan cara destilasi menggunakan air sebagai pelarut.

J.2 Peralatan

- labu destilasi kapasitas 1000 ml;
- pendingin;
- penampung minyak dan air atau *trap*;
- *heating mantel* kapasitas 1000 ml;
- gelas piala kapasitas 250 ml;
- neraca analisis kapasitas 200 g, ketelitian 0,1 mg.

J.3 Prosedur

J.3.1 Timbang dengan teliti mendekati 1 g, kira-kira 35 g sampai 40 g contoh dengan gelas piala dan pindahkan ke dalam labu destilasi.

J.3.2 Tambahkan air suling sampai contoh terendam air seluruhnya dan aduk dengan sempurna. Ke dalam labu destilasi sebelumnya telah diberi beberapa butir batu didih dan anti buih.

J.3.3 Pasanglah alat destilasi sedemikian rupa dan panaskan labu tersebut sampai mendidih selama lebih kurang 6 jam. Destilasi dihentikan bila tidak ada lagi butir-butir minyak yang menetes bersama air atau volume minyak tidak bertambah.

J.3.4 Dinginkan penampung beserta isinya sampai suhu kamar atau bisa juga merendam penampung dalam air dan kemudian baca volume minyak dalam penampung.

J.4 Perhitungan

Kadar minyak atsiri dinyatakan dalam persentase volume atau bobot sebagai berikut :

$$\frac{V}{M_1} \times 100$$

Keterangan :
V adalah volume minyak yang dibaca (ml)
M_1 adalah bobot contoh uji (g)

Bibliografi

[BAM] *Bacteriological Analytical Manual.2006. Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration. Gaithersburg, USA : AOAC Internasional*.

[BAM] *Bacteriological Analytical Manual.2001. Division of Microbiology. U.S. Food and Drug Administration. Gaithersburg, USA : AOAC Internasional.*

ISO 959-1:1998 *Pepper (Piper nigrum L.), whole or ground - Specification - Part 1: Black pepper.*

International Pepper Community Grade of Black and White, Whole, Pepper. http://www.ipcnet.org/ (diakses tanggal 17 November 2011).